

**IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa  
„Nauki przyrodnicze na rzecz człowieka i środowiska”  
16 kwietnia 2021**



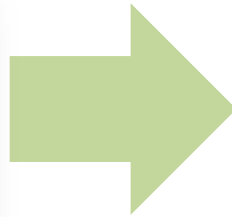
Fundacja  
**TYGIEL**

**Wykorzystanie dostępnych narzędzi  
diagnostycznych w ocenie jakości nasienia ryb,  
ich biologicznego potencjału oraz możliwości  
zapładniającej**

*dr hab. inż. Beata I. Cejko*  
[b.cejko@pan.olsztyn.pl](mailto:b.cejko@pan.olsztyn.pl)

*Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu  
Zwierząt i Badań Żywności  
Polska Akademia Nauk, Olsztyn*

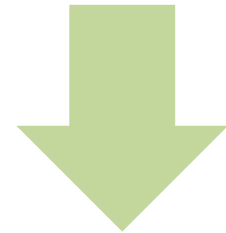
# Jakość gamet



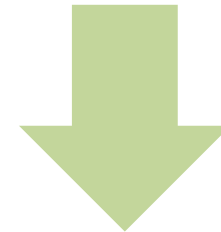
**Wzrost oraz rozwój stadiów młodocianych**



**Efektywność zapłodnienia**



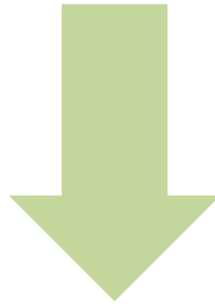
**Sukces rozrodu**



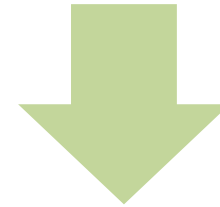
**Wzrost produkcji w akwakulturze**

## Dostępne narzędzia diagnostyczne

- System CASA
- NucleoCounter
- Cytometr przepływowy
- pH-metr
- Osmometr



## Ocena jakości nasienia



## Możliwości i perspektywy

## Możliwość szczegółowej oceny jakości plemników

- Ruchliwość plemników
- Parametry kinetyczne plemników
- Żywotność plemników
- Stabilność błon komórkowych plemników
- Potencjał mitochondrialny
- Dojrzałość plemników
- Zdolność zapładniająca plemników



# System CASA

## Ruchliwość plemników

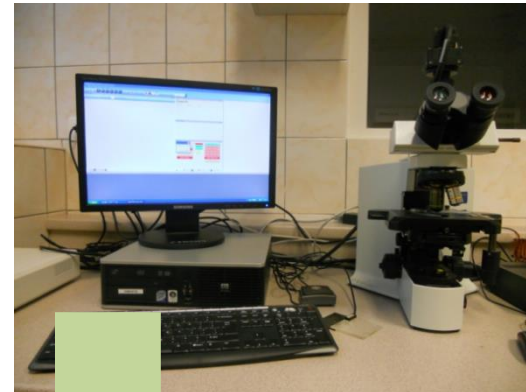
Główny wyznacznik jakości nasienia na podstawie którego, dokonuje się oceny jakości gamet męskich i szacuje ich zdolność do zapłodnienia ikry

### Metoda subiektywna



**przeszacowane lub niedoszacowane  
wartości ruchliwości plemników,  
które mogą mieścić się w granicach  
30-60%.**

### Systemy komputerowe

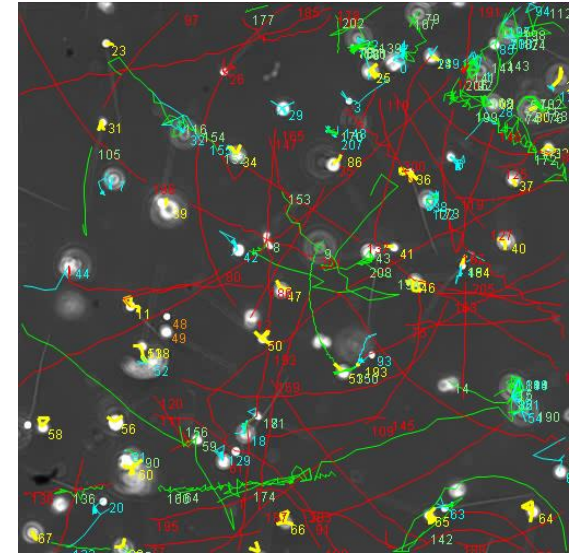


**obiektywność pomiaru wartości  
ruchliwości plemników oraz  
wyznaczenie szeregu parametrów  
kinetycznych**

# System CASA

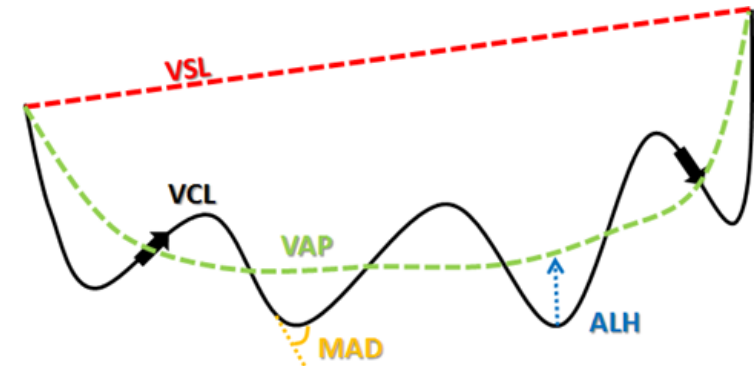
## Parametry I-rzędowe:

- **MOT (%): odsetek plemników ruchliwych**
- PRG (%): odsetek plemników o ruchu progresywnym
- VAP ( $\mu\text{m/s}$ ): średnia prędkość plemnika
- **VCL ( $\mu\text{m/s}$ ): krzywoliniowa prędkość plemnika**
- VSL ( $\mu\text{m/s}$ ): prostoliniowa prędkość plemnika
- MAD ( $^\circ$ ): średnia kątowa zmiana kierunku ruchu
- ALH ( $\mu\text{m}$ ): amplituda bocznych wychyleń główki
- BCF (Hz): częstotliwość uderzeń wtki



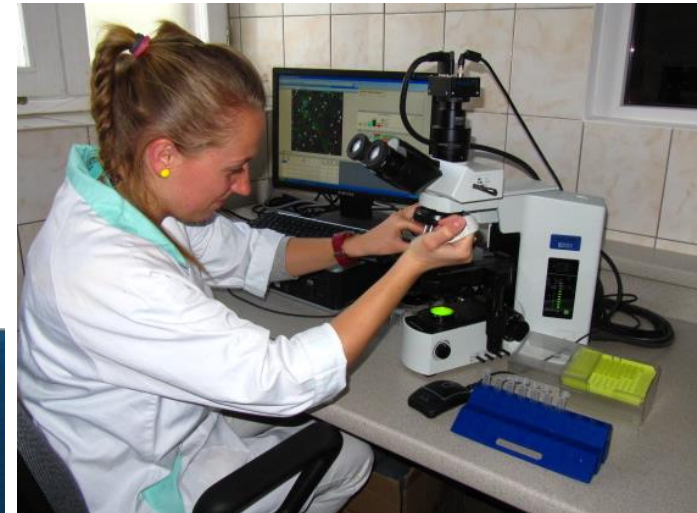
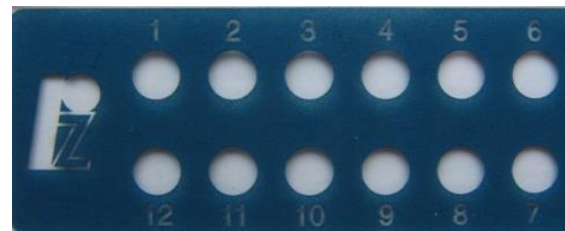
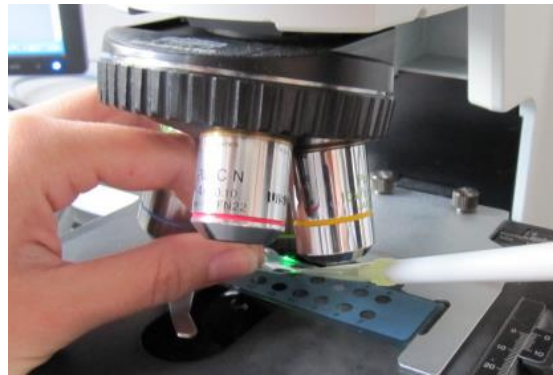
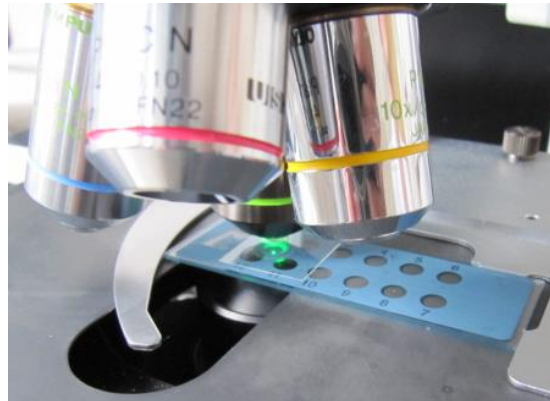
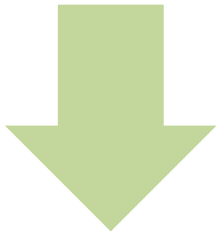
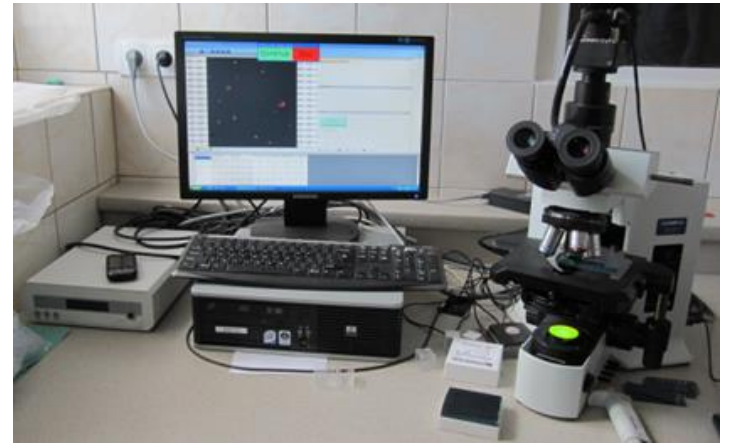
## Parametry II-rzędowe:

- LIN ( $\text{VSL} \times \text{VCL}^{-1} \times 100\%$ ): liniowość ruchu
- STR ( $\text{VSL} \times \text{VAP}^{-1} \times 100\%$ ): kierunkowość ruchu
- WOB ( $\text{VAP} \times \text{VCL}^{-1} \times 100\%$ ): wskaźnik drgań plemnika





# System CASA



## Koncentracji plemników

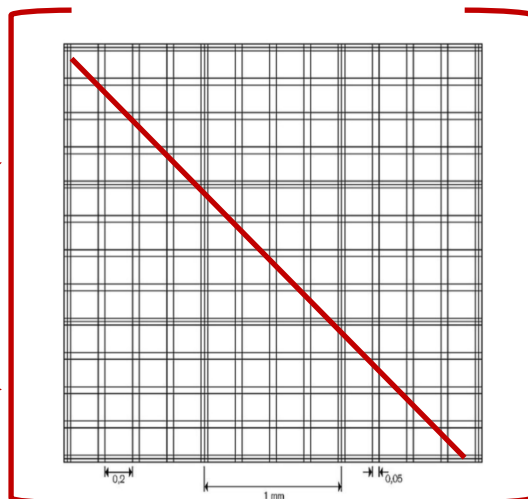
W ocenie jakości plemników istotne znaczenie odgrywa pomiar koncentracji plemników, która jest cechą gatunkową

### Metoda subiektywna

- brak możliwości precyzyjnego zliczania
- obecność agregatów komórek
- metoda czasochłonna



komora Bürkera



**średnia ilość  
plemników z 10 pól  
(kwadracików) x 250 x  
1000 x  
rozcieńczenie =  
koncentracja/ml**

# NucleoConter

Stosowana obecnie nie tylko w laboratoriach naukowych, ale również w przemyśle farmaceutycznym czy spożywczym (browary, mleczarnie)

## Technika mikroskopii fluorescencyjnej

- możliwość precyzyjnego zliczania
- obiektywność pomiaru
- możliwość szybkiego pomiaru żywotności plemników
- mobilność urządzenia



stosowanie urządzenia wymaga zakupu kasetek i ich późniejszej utylizacji ze względu na zawartość substancji toksycznych



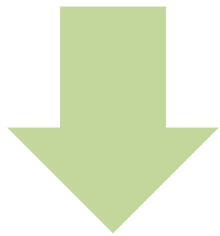


# Cytometr przepływowy

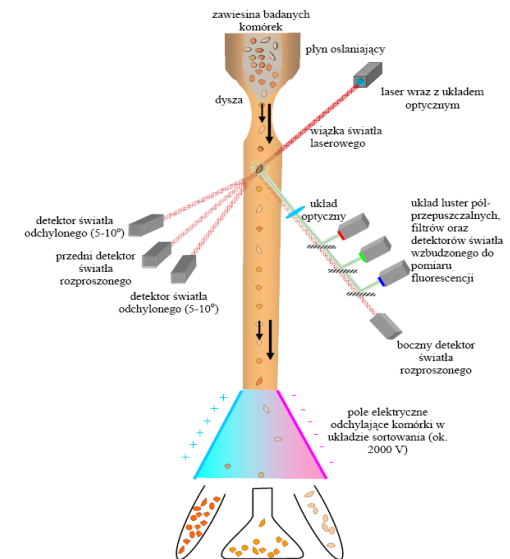
## Żywotność plemników/stabilność błon komórkowych

W ocenie jakości nasienia ryb istotną rolę odgrywają także inne parametry plemników takie jak ich żywotność czy stabilność ich błon komórkowych

**Cytometria przepływowa jest metodą pozwalającą na pomiar kształtu, wielkości i fluorescencji pojedynczych komórek lub cząsteczek przepływających przez aparat w strumieniu cieczy**



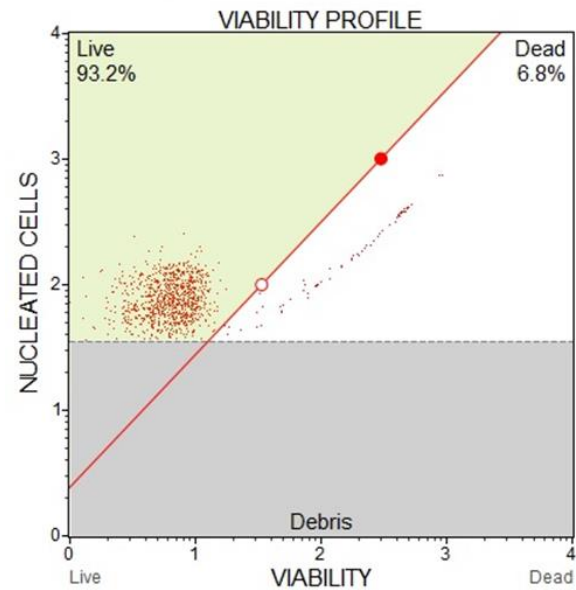
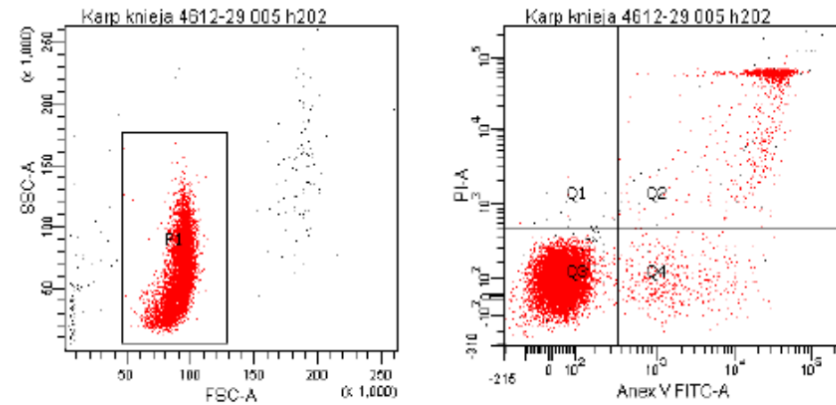
- analiza struktur plemników oraz ich funkcji
- analiza żywotności plemników
- ocena integralności akrosomu
- ocena funkcjonowania mitochondriów
- ocena integralności DNA



# Cytometr przepływowy



FACSDiva Version 6.1.3



# pH-metr

Odczyn pH nasienia i plazmy nasienia to parametr na podstawie którego określić można stopień dojrzałości płciowej samców ryb

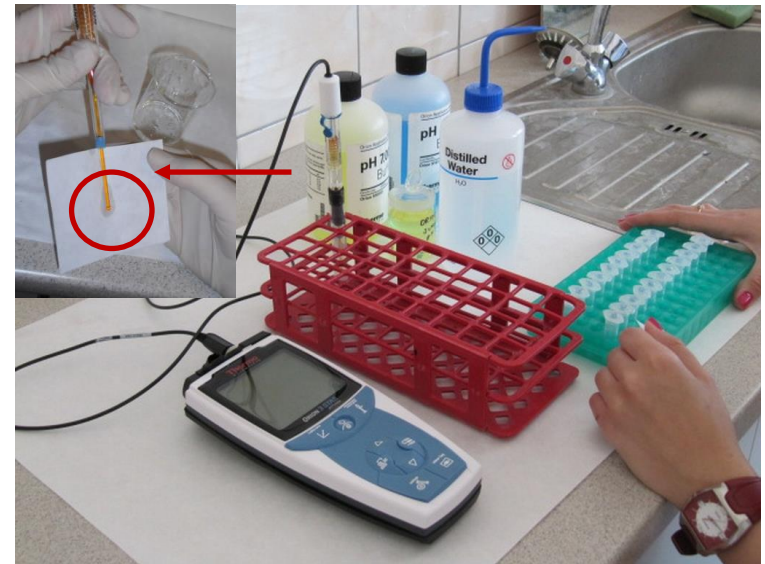
## pH-metr stacjonarny



rzadko używane w diagnostyce jakości nasienia ze względu na konstrukcję urządzenia



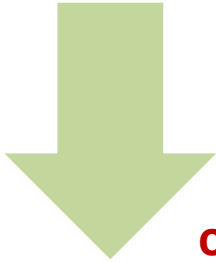
## pH-metr przenośny



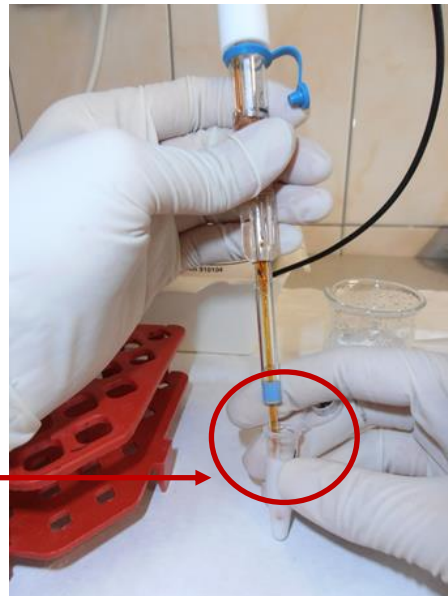
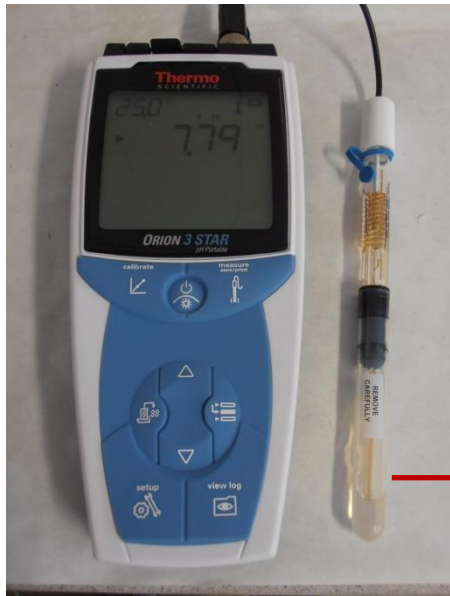
używane w diagnostyce jakości nasienia ze względu na konstrukcję urządzenia

# pH-metr

Średnica diody takiego urządzenia jest na tyle mała, że umożliwia pomiar pH w próbach o niewielkiej objętości plazmy nasienia czy też samego nasienia (<20 µl)

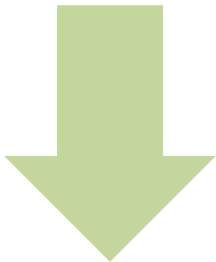
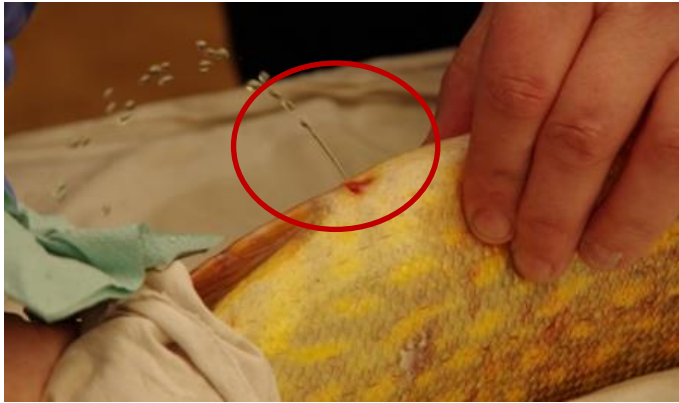


**wykorzystanie do monitorowania jakości nasienia przechowywanego krótkookresowo w warunkach chłodniczych, bądź też do kontroli jakości nasienia samców *post-mortem***



## Osmometr

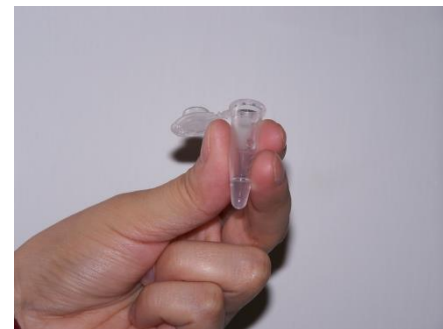
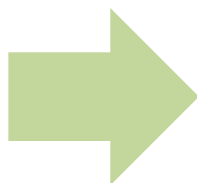
Osmolalność plazmy nasienia to parametr, który wskazuje na potencjalne zanieczyszczenie nasienia moczem mającej niekiedy miejsce podczas wycierania tarlaków w warunkach kontrolowanych



**Obniżona jakość – brak sukcesu w zapłodnieniu**



# Osmometr



Wykorzystanie osmometru wymaga  
uprzedniego przygotowania próby, która  
polega na otrzymaniu plazmy nasienia

## ***Podsumowanie***

- Kompleksowa analiza wyznaczników jakości oraz parametrów biochemicznych nasienia oddaje kondycję samców, zdolność plemników do ruchu oraz zapłodnienia
- Dostępność narzędzi diagnostycznych umożliwia i ułatwia ocenę potencjału biologicznego samców ryb, tak jak ma to miejsce u innych zwierząt gospodarskich
- Większość narzędzi diagnostycznych ma zastosowanie w pracach laboratoryjnych, ale ich wysoka czułość i możliwość uzyskania obiektywnych wyników sprawia, że w niedalekiej przyszłości znajdą one zastosowanie także w warunkach produkcyjnych
- Stosowanie w warunkach produkcyjnych wysoko specjalistycznego sprzętu (systemy komputerowe, cytometry przepływowe) jest rzadko praktykowane, dlatego warto w takich warunkach stosować narzędzia dostępne komercyjnie i proste tj. NucleoCounter czy pH-metr, gdzie ich obsługa nie będzie stanowić żadnej trudności, a interpretacja uzyskanych wyników budzić zastrzeżeń.

**Badania finansowano z środków Unii Europejskiej z Funduszu Strukturalnego w ramach realizacji Programu Doradztwa Rybackiego „Pozyskiwanie, przechowywanie i zapładnianie gamet ryb” akronim Fish-RePro. Program Operacyjny „Rybacktwo i Morze” na lata 2014-2020.**

***Dziękuję za uwagę***

*dr hab. inż. Beata I. Cejko*

*[b.cejko@pan.olsztyn.pl](mailto:b.cejko@pan.olsztyn.pl)*

*Zakład Biologii Gamet i Zarodka,  
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności  
Polska Akademia Nauk  
ul. Bydgoska 7, 10-243 Olsztyn*